

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/46, 16/28, 16/30, C12N 5/10	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/17374 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Mai 1997 (15.05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04765 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. November 1996 (02.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 43 039.5 8. November 1995 (08.11.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEDAC GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE SPEZIALPRÄPARATE GMBH [DE/DE]; Fehlandt- strasse 3, D-20354 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZIEGLER, Andreas [DE/DE]; Spandauer Damm 130, D-14050 Berlin (DE). STEIN, Harald [DE/DE]; Freie Universität Berlin, Universitätsklinikum Steglitz, Institut für Pathologie, Hindenburgdamm 30, D-12203 Berlin (DE). (74) Anwalt: VOELKER, Ingeborg; Uexküll & Stolberg, Beseler- strasse 4, D-22607 Hamburg (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(54) Title: RECOMBINANT LIGANDS FOR THE HUMAN CELL MEMBRANE ANTIGEN CD30 (54) Bezeichnung: REKOMBINANTE LIGANDEN FÜR DAS MENSCHLICHE ZELLMEMBRAN-ANTIGEN CD30 (57) Abstract <p>The invention relates to novel recombinant DNA molecules or parts thereof which code for variable immunoglobulin chains, or fragments thereof, having specificity for the human cell membrane molecule CD30. Also produced are expression vectors containing the novel DNA molecule and host cells transformed with those expression vectors and capable of producing the novel ligands. Also described is a process for producing ligands of the designated specificity with the aid of the transformed host cells, the resulting ligands themselves, and diagnostic and pharmaceutical preparations containing them.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige rekombinante DNA-Moleküle oder Teile derselben, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente davon kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembranmolekül CD30 aufweisen. Ferner werden Expressionsvektoren, die diese DNA-Moleküle enthalten, sowie damit transformierte Wirtszellen bereitgestellt, die in der Lage sind, die neuartigen Liganden zu produzieren. Darüber hinaus werden ein Verfahren zur Herstellung von Liganden der bezeichneten Spezifität unter Verwendung der transformierten Wirtszellen, die daraus resultierenden Liganden sowie diese enthaltende diagnostische und pharmazeutische Präparate beschrieben.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Rekombinante Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige rekombinante DNA-Moleküle, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente derselben kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 aufweisen. Die Erfindung betrifft ferner Expressionsvektoren, die diese DNA-Moleküle enthalten, sowie damit transformierte Wirtszellen, die in der Lage sind, die neuartigen Liganden zu produzieren. Darüber hinaus werden ein Verfahren zur Herstellung von Liganden der bezeichneten Spezifität unter Verwendung der transformierten Wirtszellen, die daraus resultierenden Liganden sowie diese enthaltende diagnostische und pharmazeutische Präparate bereitgestellt.

Das CD30-Antigen ist ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 120 kD, wenn diese durch eine SDS-Elektrophorese bestimmt wird. Das besondere an dem CD30-Antigen ist, daß es normalerweise im Organismus nur auf sehr wenigen aktivierten T-Zell- und B-Zell-Blasten und an diesen auch nur in geringer Dichte vorhanden ist (Stein et al., "Identification of Hodgkin and Sternberg-Reed cells as a unique cell type derived from a newly detected small cell population", Int. J. Cancer, 30, S. 445-459, 1982; Stein et al., "The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells", Blood, 66, S. 848-858, 1985; Schwartz et al., "Ber-H2: a new monoclonal antibody of the Ki-1 family for the detection of Hodgkin's disease in formaldehyde-fixed tissue sections (A2.13)", in: Leucocyte Typing III, White Cell Differentiation Antigens, A.J. McMichael, Hrsg., Oxford University Press, Oxford - New York - Tokyo, S. 574-575, 1987),

während es aber bei einer Reihe von lymphoproliferativen Prozessen und bei embryonalen Karzinomen in sehr viel höherer Konzentration exprimiert wird. Zu den stark CD30-positiven malignen Lymphomen gehören in erster Linie die Hodgkin-Lymphome, das
5 anaplastische großzellige Lymphom wie auch die akute Form der adulten T-Zell-Leukämie.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß das CD30-Molekül selektiv von aktivierten T_H2 -Blasten (S. Romagnani, "Induction of T_H1 and
10 T_H2 responses: a key role for the 'natural' immune response?", Immunol. Today, 13, S. 379-381, 1992) in vitro und in vivo exprimiert wird (Del Prete et al., "CD30, Th2 cytokines and HIV infection: a complex and fascinating link", Immunol. To-
day, 16(2): 76-80, 1995). Bei Patienten mit allergischen Erkrankun-
15 gen war die Zahl der CD30⁺ T_H2 -Blasten im Vergleich zu Normalpersonen um ein Vielfaches erhöht. Es ist daher denkbar, daß die Mehrzahl der Autoaggressionserkrankungen auf eine Fehlsteuerung der T_H -Antwort mit Vermehrung von T_H2 -Zellen zurückzuführen ist.

20 Wegen des äußerst seltenen Vorkommens des CD30-Moleküls im normalen Organismus und der hohen Expression dieses Moleküls auf den Tumorzellen der oben genannten Lymphome und des embryonalen Karzinoms sowie auf aktivierten T_H2 -Blasten sind eine auf die Ex-
pression des CD30-Moleküls aufbauende Diagnostik und Therapie
25 eine wichtige Strategie zur Erkennung und Behandlung der genannten Erkrankungen.

Es sind bereits Immunotoxine versuchsweise in vivo beim Menschen angewendet worden, mit denen Hodgkin-Lymphomzellen erkannt bzw.
30 eliminiert werden können (B. Falini et al., "Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin", Lancet, 339, S. 1195-1196, 1992; Falini et al., "In vivo targeting of Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with monoclonal antibody Ber-H2 (CD30): Immunohistological evi-
35 dence", Brit. J. Haematol., 82, S. 38-45, 1992).

Die primäre Diagnostik der CD30-positiven Krebsformen wird gegenwärtig immunhistologisch durchgeführt, wobei als Antikörper z.Z. ausschließlich Reagenzien der Maus wie z.B. Ber-H2 eingesetzt werden. Bei diesem Reagenz handelt es sich um einen gegen
5 das CD30-Molekül gerichteten monoklonalen Antikörper, der 1987 in einem Kurzbeitrag und 1989 in ausführlicher Weise von der Arbeitsgruppe der Erfinder beschrieben wurde (Schwartz et al., "Ber-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope", Blood, 74, S. 1678-1689, 1989).
10 Dieser Antikörper wird von der gleichnamigen Maus-Myelom-Hybridzelllinie sezerniert, die am 28.01.1992 bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), Public Health Laboratories Service Board, 61 Collindale Avenue, London, NW9 5DF, nach den Bestimmungen des Budapester Vertrages unter der Hinterlegungs-
15 nummer Ber-H2 92012823 hinterlegt worden ist. Allerdings ist es bei der Massenproduktion dieses Antikörpers in Langzeitkultur (etwa in Fermentern) von erheblichem Nachteil, daß die Antikörper-produzierenden Zellen bereits nach einigen Generationen von solchen Zellen überwachsen werden, die die Fähigkeit zur Antikörperproduktion verloren haben, offenbar weil letztere nicht
20 mehr in der Lage sind, schwere Immunglobulinketten oder auch schwere und leichte Immunglobulinketten zu synthetisieren.

Die Ausbreitungsdiagnostik der genannten Tumorerkrankungen erfolgt in der Regel durch Computertomographie, Sonographie und/
25 oder Lymphographie. Die genannte nicht-invasive Ausbreitungsdiagnostik ist jedoch mit dem Nachteil verbunden, daß lediglich relativ große Tumormassen identifiziert werden können, kleinere Tumore oder Metastasen jedoch nicht nachweisbar sind. Die deshalb oft zusätzlich angewendete chirurgische Ausbreitungsdiagnostik ist für den Patienten sehr belastend und auf bestimmte Körperhöhlen (z.B. Bauchhöhle) beschränkt. Die gegenwärtig medizinisch ausschließlich akzeptierte und deswegen angewendete
30 Standardtherapie der CD30-positiven Tumore erfolgt mit einer unspezifischen Radio- und/oder Chemotherapie. Obgleich die Er-

folgsrate ca. 60 - 70 % beträgt, gibt es für die Therapieversager bisher kein kuratives Konzept.

5 Deshalb wurde der monoklonale Antikörper Ber-H2 mit pflanzlichen
Giften konjugiert und versuchsweise zur Therapie von Patienten
mit Morbus Hodgkins in terminaler Krankheitsphase eingesetzt
(Falini et al., "Response of refractory Hodgkin's disease to
monoclonal anti-CD30 immunotoxin", Lancet, 339, S. 1195-1196,
1992). Dabei zeigten die vier behandelten Patienten innerhalb
10 von 10 Tagen eine Tumormassenreduktion um 50% bis nahezu 100%.
Allerdings kam es in allen Fällen nach unterschiedlicher Zeit
zum Neuauftreten von Tumormassen an den alten und/oder neuen
Lokalisationen. Eine Wiederholung der Immunotoxinapplikation war
nicht möglich, weil die so behandelten Patienten ausnahmslos
15 Antikörper gegen den Maus-Antikörper Ber-H2 gebildet hatten.

Die immunologisch begründete Problematik der in-vivo Applikation
von Maus-Antikörpern gegen das CD30-Molekül für diagnostische
und therapeutische Zwecke läßt sich drastisch reduzieren, wenn
20 anstelle des Maus-Antikörpers ein nicht oder nur geringfügig
immunogenes Protein mit Spezifität für das CD30-Antigen einge-
setzt wird.

Es besteht heute die Möglichkeit, die variablen Regionen von
25 schwerer (V_H) und leichter (V_L) Kette eines Maus-Antikörpers an
die entsprechenden konstanten Regionen C_H und C_L eines menschl-
lichen Antikörpermoleküls anzufügen. Durch diese Manipulation
werden die für den Menschen immunogenen Bereiche des Antikörper-
Moleküls weitgehend beseitigt, während die Spezifität des ur-
30 sprünglichen Maus-Antikörpers in dem chimären Molekül zumeist
erhalten bleibt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt daher in der Be-
reitstellung von neuen CD30-spezifischen Substanzen mit vermin-
35 derteter Immunogenität. Ferner soll die Instabilität der Zelllinie

Ber-H2 in Bezug auf die Produktion des monoklonalen Antikörpers verbessert werden.

5 Zur Lösung der gestellten Aufgabe werden erfindungsgemäß die Gegenstände der Ansprüche 1, 6, 9, 13, 15, 25 und 26 vorgeschlagen, wobei bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung in den jeweiligen Unteransprüchen angegeben sind.

10 Erfindungsgemäß werden somit rekombinante DNA-Moleküle bereitgestellt, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente derselben kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 aufweisen, wobei die rekombinanten DNA-Moleküle Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen, die vorzugsweise vollständig oder
15 teilweise operativ miteinander verknüpft sind. Ferner ist es bevorzugt, daß diese Sequenzen oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sind, die für konstante Teile eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls kodieren.
20

Der vorliegend verwendete Begriff "syngen" bezeichnet erfindungsgemäß isogene, homologe oder genetisch nahe verwandte DNA-Sequenzen, und umfaßt alle Sequenzen, Fragmente und Varianten,
25 die sich von dem gleichen oder homologen Gen ableiten und für die erfindungsgemäßen Immunglobulinketten oder Fragmente derselben kodieren.

Nach einer weiteren Ausführungsform umfassen die rekombinanten
30 DNA-Moleküle jeweils einen oder mehrere der hypervariablen Bereiche (die auch als CDR für "complementarity determining residues" bezeichnet werden) der in den SEQ ID NOS: 1 oder 3 bzw. in den SEQ ID NOS: 4 oder 6 angegebenen Sequenzen oder syngene oder allelische Varianten derselben.

Schließlich können die in den SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 angegebenen Sequenzen oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sein, die für toxische Proteine oder Enzyme kodieren.

5

Ferner werden erfindungsgemäß Expressionsvektoren bereitgestellt, die ein oder mehrere der genannten rekombinanten DNA-Moleküle in operativer Verknüpfung mit Expressionskontroll-Sequenzen enthalten und vorzugsweise für die Expression in Prokaryonten- und/oder Eukaryonten-Wirtszellen geeignet sind.

10

Weiterhin stellt die Erfindung Wirtszellen zur Verfügung, die mit den genannten Expressionsvektoren transfiziert sind, wobei Prokaryonten- oder Eukaryonten-Zellen in Betracht kommen, wobei die bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) am 8. August 1995 unter der Zugriffsnummer DSM ACC2224 nach den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegte Eukaryonten-Zelle CH-BerH2 bevorzugt ist.

15

Im übrigen wird ein Verfahren zur Herstellung von Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 bereitgestellt, bei dem man eine der genannten Wirtszellen in einem geeigneten Nährmedium kultiviert, anschließend die Zellen von dem Medium abtrennt und die Liganden als Expressionsprodukte aus dem Medium oder aus dem Cytoplasma der Wirtszellen isoliert. Vorzugsweise werden die Liganden anschließend gereinigt und mit üblichen Hilfs- und Trägerstoffen zu pharmazeutischen oder diagnostischen Präparaten formuliert.

25

Ferner werden rekombinante Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 bereitgestellt, die mindestens die in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben umfassen. Vorzugsweise umfassen diese Liganden jeweils einen oder mehrere der hypervariablen CDR-Bereiche der in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder syngene oder allelische Varianten

35

derselben. Nach einer besonderen Ausführungsform sind in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebene Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben untereinander verknüpft. Ferner können diese Sequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben vorzugsweise mit konstanten Teilen eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls verknüpft sein. Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die vorstehend genannten rekombinanten Liganden peptidisch oder über Linker-Moleküle mit toxischen Proteinen oder mit Enzymen bzw. Proenzymen verknüpft, wobei die Toxine vorzugsweise in Form von Ribosomen-inaktivierenden Proteinen vorliegen und die Enzyme vorzugsweise aus der Gruppe der Phosphodiesterasen ausgewählt sind. Nach einer alternativen Ausführungsform sind die vorstehend genannten rekombinanten Liganden direkt oder über Linker-Moleküle kovalent oder konjugiert mit photoaktivierbaren Verbindungen oder mit radioaktiven Isotopen verknüpft, wobei letztere vorzugsweise aus der Gruppe bestehend aus Indium, Jod, Yttrium, Technetium, Rhenium, Kupfer und Lutetium ausgewählt sind. Die Verknüpfung kann beispielsweise unter Verwendung von Chelatbildnern oder über photochemische Aktivierungsprozesse erfolgen (vgl. WO 94/04189).

Schließlich werden diagnostische oder pharmazeutische Präparate bereitgestellt, die vorzugsweise einen oder mehrere der vorstehend genannten oder durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellte Liganden gegebenenfalls in Kombination mit üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln enthalten. Beispiele für übliche Trägerstoffe sind z.B. Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Alkohole, Polyethylenglykole, Glycerinester, Gelatine, Kohlenhydrate, wie Laktose und Stärke, Calciumcarbonat, Magnesiumstearat, Talkum. Übliche Zusatzstoffe sind z.B. Konservierungsstoffe, Gleitmittel, Netzmittel und Emulgatoren, Farbstoffe, Geschmackskorrigentien und Aromastoffe. Die Auswahl der Träger- und Zusatzstoffe hängt davon ab, ob die erfindungsgemäßen Zubereitungen enteral, parenteral oder lokal appliziert werden sollen. Beispiele für erfindungsgemäß in Betracht

kommende Darreichungsformen sind Lösungen, Dragees, Kapseln, Tabletten, Injektions- und Infusionslösungen sowie transdermale Pflaster.

- 5 Diese Präparate dienen vorzugsweise der Diagnostik und/oder Behandlung von Krebsformen wie insbesondere der Hodgkinschen Erkrankung, bei denen das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 auf Zellen exprimiert wird, die für die Erkrankung von Bedeutung sind.

10

Zur Lösung des der Erfindung zugrunde liegenden Problems wurden ausgehend von dem Maus-Antikörper Ber-H2 die Sequenzen der variablen Region der leichten (V_LJ) und schweren Ketten (V_HDJ) dieses CD30-reaktiven monoklonalen Antikörpers bestimmt. Die zugehörigen genomischen Sequenzen wurden dann mit den Sequenzen für die konstanten Regionen eines menschlichen Immunglobulinmoleküls verbunden. Das resultierende Konstrukt wurde in einer geeigneten Zelle, vorzugsweise einer keine eigenen Immunglobulinketten produzierenden Myelomzelllinie, zur Expression gebracht.

20

Erfindungsgemäß wurde zunächst die zytoplasmatische RNA aus kultivierten, den Antikörper Ber-H2 produzierenden Zellen der Mausmyelomhybridlinie isoliert. Anschließend wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase eine cDNA-Synthese von V_LJ und V_HDJ durchgeführt, wobei die verwendeten, nachfolgend angegebenen Oligonukleotide dem 5'-Ende der konstanten Regionen der L- bzw. H-Kette komplementär waren:

30

5' AGATGGATACAGTTGGT 3' (konL1)
5' GGGGCCAGTGGATAGAC 3' (konH1)

Um die cDNAs durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizieren zu können, wurden sie mit Guanosin-Trinukleotiden so verlängert, daß ein Poly-C-Anker-oligo mit der nachfolgend angegebenen Sequenz als 5'-Primer dienen konnte:

35

- 9 -

5' GCGCGGCCGCGGAGGCCCCCCCCCCCCCCC 3' (AN-Poly-C).

Als 3'-Primer wurden die bereits zur cDNA-Synthese verwendeten Oligonukleotide konL1 bzw. konH1 eingesetzt. In weiteren PCR-Reaktionen wurden die cDNAs mit den nachfolgend angegebenen 3'-Oligonukleotiden konL2 bzw. konH2 sowie mit dem angegebenen Ankerprimer am 5'-Ende, die jeweils überhängende Restriktions-schnittstellen trugen, amplifiziert:

10 5' GGAATTCGGATACAGTTGGTGCAGC 3' (konL2)
 5' GGAATTCGTGGATAGACAGATGGG 3' (konH2)
 5' GCGCGGCCGCGGAGG 3' (Ankerprimer)

Zur Bestimmung der cDNA-Sequenzen wurden die erhaltenen Fragmen-
15 te in handelsübliche Sequenzierungsvektoren kloniert (z.B. unter Verwendung des Vektors pGEM[®]-11zf(+) von Promega, Heidelberg).

Die Sequenzanalysen ergaben, daß das V-Gensegment der leichten
Kette des mAk Ber-H2 mit dem J₂-Gensegment, das der schweren
20 Kette mit dem J₃-Gensegment rekombiniert war.

Mit Hilfe dieser cDNA-Sequenzen konnten in einem weiteren Schritt 5'-Primersequenzen festgelegt und synthetisiert werden, die im untranslatierten Bereich des jeweiligen Gens liegen. Da
25 die Intronsequenzen sämtlicher J-Minigene bekannt und über Genbanken zugänglich sind, konnten hieraus ferner 3'-Primersequenzen abgeleitet werden, die im nicht-kodierenden Bereich der DNA der Mausmyelomhybridlinie liegen. Auf diese Weise war es möglich, diese genomische DNA nach PCR-Amplifikation gerichtet zu
30 klonieren, ohne die originale Genstruktur (5'-UTR - Exon 1 - Intron - Exon 2 - J-Intron) zu verändern.

Um vollständige Sequenzen zu erhalten, wurden die V_LJ- bzw. V_HDJ-PCR-Produkte dann zunächst in geeignete Sequenzierungsvektoren
35 kloniert und die "Insert"-Bereiche von jeweils drei Klonen vollständig sequenziert. Parallel hierzu wurden die PCR-Produkte als

Referenz direkt sequenziert. Nach Überprüfung des korrekten Leserahmens und des Nichtvorhandenseins von Stop-Codons innerhalb der klonierten DNA wurde jeweils ein zu den PCR-Produkten sequenzhomologer Klon in die entsprechenden Expressionsvektoren (pUHW₁, bzw. pUHW_k) umkloniert. Diese Vektoren enthielten die für die konstanten Teile eines humanen Antikörpers kodierenden Sequenzen, ein murin/humanes Intronhybrid, einen Selektionsmarker, sowie die zur effizienten Expression notwendigen Maus-Promotor- und Enhancerelemente.

Nach Linearisierung der Plasmide wurde eine Kotransfektion beider Konstrukte in Sp2/0-Ag14-Zellen (M. Shulman et al., Nature, 276, S. 269-270, 1978) durchgeführt. Diese Zellen haben die Fähigkeit verloren, eigene Immunglobulinketten zu synthetisieren. Stabile Transfektanten wurden darauf durch Geneticin-Selektion isoliert. Die Austestung der Kulturüberstände erfolgte mit der Immunfluoreszenztechnik auf L428KS-Zellen, einer Hodgkin-lymphomlinie (V. Diehl et al., "Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines", Cancer Treatment Reports, 66, S. 615-632, 1982). Mehrere positive Primärkulturen wurden gefunden und jeweils kloniert und rekloniert. Zur Spezifitätsabklärung des sezernierten Antikörpers wurde untersucht, ob das Reaktionsspektrum des chimären Proteins dem des murinen mAk Ber-H2 entsprach. Sowohl ein Panel von CD30⁺- bzw. CD30⁻-Zelllinien in der Immunfluoreszenz als auch die immunhistologische Austestung an humanem Morbus Hodgkin-Gewebe ergaben, daß das chimärisierte Reagenz eine mit dem ursprünglichen Maus-Antikörper Ber-H2 vergleichbare Spezifität aufweist.

Der Vorteil der hier dargelegten erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. ihrer Produkte gegenüber dem Stand der Technik besteht zum einen in der weit geringeren Immunogenität im menschlichen Körper und zum anderen in deren vielfältigen Manipulationsmöglichkeiten, die sich aufgrund der Kenntnis der DNA-Sequenzen ergeben. So ist es z.B. möglich, ein Protein mit CD30-Spezifität in Bakterien oder Insektenzellen mit viel niedrigeren Kosten herzu-

- 11 -

stellen, als in der konventionellen Zellkultur. Die Kenntnis der Sequenzen ermöglicht auch die Kopplung mit anderen DNA-Sequenzen, die für aktivierende oder toxische Proteine, Enzyme oder Liganden von Abwehrzellen kodieren. Ferner können Fragmente der Gesamtsequenzen wie z.B. isolierte hypervariable Regionen für die Synthese entsprechender Proteinfragmente eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen veranschaulicht.

Beispiel 1

Isolierung von Nukleinsäuren aus Myelomhybridzellen

Etwa 2×10^8 Zellen der Mausmyelomhybridlinie Ber-H2 wurden mittels Zentrifugation pelletiert, in 100 µl PBS resuspendiert und in 4 ml GT-Puffer (enthaltend 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, 0,5 % Natriumlaurylsarcosin, 100 mM β-Mercaptoethanol, pH-Wert 7,0) lysiert. Die erhaltene Suspension wurde auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten geladen, welcher 2 ml 5,7 M Cäsiumchlorid, 1,5 ml 40 % (Gew./Vol.) CsCl, 1,5 ml 30 % (Gew./Vol.) CsCl und 1 ml 20 % (Gew./Vol.) CsCl enthielt. Nach einer 20 Stunden langen Zentrifugation mit 35 000 UpM bei 15°C wurde die pelletierte cytoplasmatische RNA gewonnen, in destilliertem Wasser gelöst, durch PIC-Extraktion (50 Vol.-% Phenol, 48 Vol.-% CHCl₃, 2 Vol.-% Isoamylalkohol) aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Die Präzipitate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Beispiel 2

cDNA-Synthese

Ein etwa 100 µg RNA entsprechendes Volumen des gemäß Beispiel 1 erhaltenen Präzipitats wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt. Das

- 12 -

Präzipitat wurde 15 Minuten lang bei 4°C mit 14 000 UpM zentrifugiert, mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, und die RNA wurde in 15 µl H₂O gelöst. Nachfolgend wurde der Ansatz 20 Minuten lang bei 45°C mit 375 µl DMSO denaturiert, mit Ethanol gefällt und nach 15 Minuten langer Zentrifugation bei 4°C und 14 000 UpM und nach Waschung mit 70 % Ethanol in 5x RT-Puffer gelöst.

Der Reaktionsansatz für die Reverse Transkriptase enthielt je 1 mM der vier dNTP's, 1 µg c₊- bzw. c₋-Primer, 1000 Einheiten MMLV-Reverse Transkriptase (BRL), 20 µCi [³²P]dCTP, 2 Einheiten RNase Block 2 (Stratagene) und H₂O bis zu einem Endvolumen von 100 µl. Der Ansatz wurde 90 Minuten lang bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die RNA 30 Minuten lang bei 42°C mit 50 µg RNase behandelt. Nach PIC-Extraktion, Fällung, Zentrifugation und Waschen der cDNA gemäß Beispiel 1 wurde der Niederschlag in 8 µl H₂O gelöst, mit 8 µl denaturierendem Laufpuffer vermischt und auf ein Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen und 2 Stunden lang bei 54°C und 2500 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 12 Stunden lang bei -80°C auf einem Röntgenfilm exponiert. Die im Autoradiogramm den V_LJ- bzw. V_HDJ-Fragmenten entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 500 µl NH₄OAc bei 37°C eluiert. Die Eluate wurden anschließend mit Ethanol gefällt und nach Zentrifugation und Waschen der DNA gemäß Beispiel 1 in 10 µl H₂O gelöst.

25

Der Ansatz für die anschließende "Tailing"-Reaktion der cDNA enthielt 1 mM dGTP, 100 mM Na-Cacodylat, 1 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM CoCl₂, 2 µg BSA, 33 Einheiten terminale Desoxynukleotidyltransferase (BRL), 5 µl cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 µl. Die Reaktion wurde 60 Minuten lang bei 37°C durchgeführt. Nach PIC-Extraktion, Ethanolfällung und Waschen der Nukleinsäure gemäß Beispiel 1 wurde die erhaltene DNA nach Lösen in 20 µl Wasser und Herstellung einer Verdünnungsreihe dem anschließenden PCR-Verfahren zugeführt.

35

Beispiel 3

PCR-Verfahren

5 Die DNA aus Beispiel 2 wurde mit Hilfe eines Poly-C-Anker-Primers (AN-Poly-C) sowie des entsprechenden 3'-c-Primers (konL1 bzw. konH1) in einer ersten PCR-Reaktion amplifiziert, wobei sich der Buchstabe c auf den konstanten Bereich bezieht. Der Reaktionsansatz enthielt 10 ng des Primers AN-Poly-C-Oligo,
10 100 ng Ankerprimer, 100 ng konL1- bzw. konH1-Oligo, 2 µl 10x PCR-Puffer (2 mM dNTP's, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH-Wert 8,4), 2 Einheiten Taq-Polymerase, 5 µl cDNA und Wasser bis zu einem Endvolumen von 20 µl. Die Reaktion erfolgte nach dem folgenden PCR-Programm: 5 Minuten 94°C, 5 Zyklen von
15 jeweils 1 Minute 94°C, 2 Minuten 42°C, 1 Minute 72°C, 30 Zyklen von jeweils 1 Minute 94°C, 1 Minute 42°C, 1 Minute 72°C und 10 Minuten 72°C.

Die auf diese Weise erhaltenen DNA-Moleküle wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die mit
20 V_x bzw. V_y korrespondierenden Banden wurden ausgeschnitten und in 100 µl H₂O 12 Stunden lang bei 4°C eluiert. Anschließend erfolgte eine zweite PCR-Reaktion mit einer Verdünnungsreihe der aus dem Gel eluierten DNA wie oben beschrieben, jedoch mit der Abwei-
25 chung, daß 3'-c-Primer (konL2 bzw. konH2) eingesetzt wurden, die Restriktionsschnittstellen-Überhänge an den 5'-Enden aufwiesen.

Beispiel 4

30 Klonierung der cDNA

Zunächst wurde sowohl der Vektor pGEM[®]-11Zf(+) (Promega, Heidelberg) als auch die erhaltene cDNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SalI 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach Dephosphorylierung des Plasmids mit 2 x 4 Einheiten Kälberdarm-Phosphatase
35 (20 Minuten 37°C, 10 Minuten 70°C) wurden Vektor und cDNA auf

einem Agarose- bzw. Polyacrylamidgel aufgetrennt, anschließend auf eine NA-45-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert und 30 Minuten lang bei 65°C mit 1M NaCl in 1x TE eluiert. Die Eluate wurden gemäß Beispiel 1 mit Ethanol gefällt, zentrifugiert, gewaschen und in H₂O gelöst. Die anschließende Ligationsreaktion erfolgte 12 Stunden lang bei 16°C, wobei der Ansatz 2 Einheiten T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Boston, USA), 1 mM ATP und 5x Ligasepuffer enthielt und das molare Verhältnis von Plasmid zu cDNA 1 : 2 betrug. Der Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation kompetenter E. coli-Bakterien (XL 1 blue) mit 200 µl Bakteriensuspension vermischt und zunächst 30 Minuten lang bei 0°C, dann 2 Minuten lang bei 42°C, dann 5 Minuten lang bei 0°C und schließlich nach Zugabe von 1 ml LB-Medium 1 Stunde lang bei 37°C im Schüttler inkubiert. Jeweils 200 µl des Ansatzes wurden auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die entstandenen Einzelkolonien wurden nun in LB-Ampicillin-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Mit der auf diese Weise erhaltenen Bakterienkultur wurde sodann eine Plasmidpräparation durchgeführt und der Klonierungserfolg wurde nach Restriktionsverdau und anschließendem Auftragen des Ansatzes auf ein Agarosegel überprüft. Die positiven Klone wurden anschließend zur Sequenzierung 30 Minuten lang bei 37°C mit 0,2N NaOH alkalisch denaturiert. Nach Ethanolfällung, Zentrifugation und Waschen des Niederschlags gemäß Beispiel 1 wurde die DNA gelöst und ein Aliquot zur Mengenabschätzung auf ein Agarosegel geladen.

30

Beispiel 5

Sequenzierung der DNA-Fragmente

Die Sequenzierung der klonierten cDNA sowie der genomischen DNA erfolgte nach der Methode von Sanger (F. Sanger, S. Nicklen und A. R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74:546 (1977)) mit

35

- 15 -

dem Sequenase-Kit-Version 2.0 (United States Biochemical, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Gelelektrophoresen erfolgten bei 54°C und einer Spannung von 1500 V.

- 5 Mit Hilfe der cDNA-Sequenzen wurden in einem zweiten Schritt Primersequenzen festgelegt und synthetisiert, um die genomische DNA zu amplifizieren. Hierbei wurden die nachfolgend angegebenen 5'-Oligonukleotide

10 5' GATCGTCGACGGAAATGCATCAGACCAGCATGGGC 3' (LCHTUKup)

bzw.

5' CATAGTCGACAATACGATCAGCATCCTCTCCACAG 3' (HACHBERup)

- so gewählt, daß sie im Bereich der 5'-untranslatierten Regionen
15 binden. Die 3'-Primer

5' ATCAGCGGCCGCACTTAACAAGGTTAGACTTAGTGAAC 3' (LCHTUKdo)

bzw.

5' GATAGCGGCCGCATGCATTTAGAATGGGAGAAGTTAGG 3' (HACHBERdo)

20

- wurden anhand der Information über das jeweils rekombinierte J-Minigen im entsprechend zugehörigen invarianten J-Intron ausgewählt. Die Primer enthielten außerdem die zur Klonierung in Expressionsvektoren notwendigen Restriktionsschnittstellen. Die
25 genomische DNA wurde mit Hilfe dieser Primer amplifiziert. Die PCR-Reaktion (5 µl 10x PCR-Puffer (1,5 mM MgCl₂, 200 mM dNTP's, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,3), 2,5 Einheiten Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Überlingen), je 5 µM Primer, 5 µl genomische DNA einer Verdünnungsreihe, ad 50 µl H₂O) wurde mit
30 folgendem Programm durchgeführt: 5 Minuten 95°C, 26 Zyklen von jeweils 1 Minute 94°C, 2 Minuten 55°C, 2 Minuten 72°C, 7 Minuten 72°C.

- Um vollständige Sequenzen zu erhalten, wurden die VJ- bzw. VDJ-
35 PCR-Produkte zunächst in Sequenzierungsvektoren kloniert (pGEM®-5Zf(+), Promega, Heidelberg) und jeweils 3 Klone vollständig

(nach Beispiel 5) sequenziert. Parallel hierzu wurde das PCR-Produkt als Referenz direkt sequenziert (Cycle-Sequencing-Kit, Perkin Elmer, Überlingen). Nach Überprüfung des korrekten Leserahmens und des Nichtvorhandenseins von Stop-Codons innerhalb der klonierten DNA wurde jeweils ein zum PCR-Produkt sequenzhomologer Klon in den entsprechenden Expressionsvektor umkloniert. Diese Vektoren enthielten die für die konstanten Teile eines humanen Antikörpers kodierenden Sequenzen, ein murin-humanes Intronhybrid, einen Selektionsmarker sowie die zur Expression notwendigen Maus-Promotor- und Enhancerelemente.

Beispiel 6

Umklonierung in Expressionsvektor und Expression des chimären Proteins

Zur Umklonierung wurden sowohl von den pGEM[®]-5-Konstrukten gemäß Beispiel 5 als auch von den Expressionsvektoren pUHW_x bzw. pUHW₁ (W. Weissenhorn et al., Gene, 106, S. 273-277, 1991) je ca. 1 µg DNA mit den Restriktionsenzymen SalI und NotI geschnitten. Nach der Restriktion wurde der Ansatz auf ein Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden, die dem VJ- bzw. VDJ-Gen entsprachen, wurden gemäß Beispiel 4 aus dem Gel isoliert. Der Restriktionsverdau, die Aufreinigung und Dephosphorylierung der Vektoren, die Ligation und Transformation sowie die Anzucht der Bakterienkultur erfolgte ebenfalls gemäß Beispiel 4. Nach Plasmidaufarbeitung und Restriktionsverdau wurde von je einem positiven Klon eine 100 ml umfassende Bakterienkultur bei 37°C angezogen. Die zur Transfektion benötigte Plasmid-DNA wurde mit dem QuiagenPlasmid-Midi-Kit (Quiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt.

Die vorbereiteten Plasmide für leichte und schwere Ketten wurden zur stabilen Transfektion mit den Restriktionsenzymen EcoRI bzw. PvuI linearisiert, gereinigt, und zur Mengenabschätzung wurde ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Transfektion

erfolgte unter Anwendung des Gene-Pulser-Geräts (Biorad, München): jeweils ca. 4 µg Plasmid und 1×10^6 Sp2/0-Maus-Myelomhybrid-Zellen wurden in 1x HeBs (20 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 700 mM Na_2HPO_4 , pH-Wert 7,5) mit 940 µF und 270 V. gepulst, bevor die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in Dulbecco's Modified Eagle's Medium unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum ausgesät wurden. Für die Selektion positiver Klone wurde dem Medium 48 Stunden nach der Aussaat das Antibiotikum G418 in einer Konzentration von zunächst 800 µg/ml zugegeben, wobei die Konzentration allerdings nach 12 Tagen auf 1200 µg/ml erhöht wurde. Nach 15 Tagen konnten Primärkulturen, deren Kulturüberstände mit L428KS-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz reagierten, identifiziert werden. Diese Transfektanten wurden kloniert, rekloniert und Überstände mit Hilfe eines Durchflußcytometers wiederum auf L428KS-Zellen analysiert. Einzelne Überstände wurden auch gegenüber CD30-negativen Zellen, z.B. der Zelllinie KG-1, untersucht, eine Reaktion konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden.

-18-

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: medac Gesellschaft fuer klinische
Spezialpraeparate mbH
- (B) STRASSE: Fehlandtstrasse 3
- (C) ORT: Hamburg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 20312

(ii) ANMELDETITEL: Rekombinante Liganden fuer das menschliche
Zellmembran-Antigen CD30

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 470 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..47

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 48..>470
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Primaerprodukt der
schweren gamma1-Kette von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE: 48..101

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 102..>470
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Schwere gamma1-Kette von
BerH2"

-19-

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 102..470
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der schweren gamma1-Kette von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 192..206
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR1 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 249..299
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR2 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 396..437
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR3 von BerH2"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AATACGATCA GCATCCTCTC CACAGACACT GAAAACTCTG ACTCACA	ATG GAA GGC	56
	Met Glu Gly	
	-18	
ACT GGA TCT TCT CTT CCT GTT TTC AGT ACT GCA GGT GTC CAC TCC CAG		104
Thr Gly Ser Ser Leu Pro Val Phe Ser Thr Ala Gly Val His Ser Gln		
-15 -10 -5 1		
GTC CAG CTT CAC GAG TCT GGG GCT GAA GTG GCA AAA CCT GGG GCC TCA		152
Val Gln Leu His Glu Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala Ser		
5 10 15		
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT ACC TAC TGG		200
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp		
20 25 30		
ATG CAC TGG ATA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA		248
Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
35 40 45		
TAC ATT AAT CCT AGC ACT GGT TAT ACT GAC TAC AAT CAG AAC TTC AAG		296
Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys		
50 55 60 65		
GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGA ACA GCC TAC ATG		344
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met		
70 75 80		

-20-

CAA CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT ACA GTC TAT TAC TGT ACA	392
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys Thr	
85 90 95	
AGA AGG GGA CCC TCG TAT GGT AAC CAC GGG GCC TGG TTT CCT TAC TGG	440
Arg Arg Gly Pro Ser Tyr Gly Asn His Gly Ala Trp Phe Pro Tyr Trp	
100 105 110	
GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	470
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
115 120	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 141 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Glu Gly Thr Gly Ser Ser Leu Pro Val Phe Ser Thr Ala Gly Val	
-18 -15 -10 -5	
His Ser Gln Val Gln Leu His Glu Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro	
1 5 10	
Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	
15 20 25 30	
Thr Tyr Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu	
35 40 45	
Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln	
50 55 60	
Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr	
65 70 75	
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr	
80 85 90	
Tyr Cys Thr Arg Arg Gly Pro Ser Tyr Gly Asn His Gly Ala Trp Phe	
95 100 105 110	
Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
115 120	

-21-

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 598 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1..6
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Restriktionsschnittstelle
SallI, synthetisch"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 7..53

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 54..98
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon1

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
- (B) LAGE: 99..179

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 180..557
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon2

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
- (B) LAGE: 558..>590
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= J3-Intron

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: join(54..98, 180..557)
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Prim.prod. d. var.
Region d. schweren gamma1-Kette v. BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 498..>590
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "J3-Minigen"

-22-

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 591..598
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Restriktionsschnittstelle NotI, synthetisch"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE: join(54..98, 180..188)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 189..557
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der schweren gamma1-Kette von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 279..293
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR1 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 336..386
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR2 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 483..524
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR3 von BerH2"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTCGACAATA CGATCAGCAT CCTCTCCACA GACACTGAAA ACTCTGACTC ACA ATG	56
Met	
-18	
GAA GGC ACT GGA TCT TCT CTT CCT GTT TTC AGT ACT GCA GGT	98
Glu Gly Thr Gly Ser Ser Leu Pro Val Phe Ser Thr Ala Gly	
-15 -10 -5	
TAGGGGCTCA CCAGTTCAAA ATCTGAAGAG GAAACAGAAT CTGAGGTGAC AGTGATACCT	158
ACTATCCTTC TGTCCACAGG T GTC CAC TCC CAG GTC CAG CTT CAC GAG TCT	209
Val His Ser Gln Val Gln Leu His Glu Ser	
-3 1 5	
GGG GCT GAA GTG GCA AAA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG	257
Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys	
10 15 20	

-23-

GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT ACC TAC TGG ATG CAC TGG ATA AAA CAG Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His Trp Ile Lys Gln 25 30 35	305
AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC ATT AAT CCT AGC ACT Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr 40 45 50 55	353
GGT TAT ACT GAC TAC AAT CAG AAC TTC AAG GAC AAG GCC ACA TTG ACT Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr 60 65 70	401
GCA GAC AAA TCC TCC AGA ACA GCC TAC ATG CAA CTG AGC AGC CTG ACA Ala Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr 75 80 85	449
TCT GAG GAC TCT ACA GTC TAT TAC TGT ACA AGA AGG GGA CCC TCG TAT Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Gly Pro Ser Tyr 90 95 100	497
GGT AAC CAC GGG GCC TGG TTT CCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC Gly Asn His Gly Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 105 110 115	545
ACT GTC TCT GCA GGTGAGTCCT AACTTCTCCC ATTCTAAATG CATGCGGCCG Thr Val Ser Ala 120	597
C	598

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 412 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..4

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 5..412
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Primaerprodukt der leichten kappa-Kette von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE: 5..91

-24-

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 92..>412
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Leichte kappa-Kette von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 92..412
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der leichten kappa-Kette von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 161..193
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Variable Region CDR1 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 239..259
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Variable Region CDR2 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 356..382
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Variable Region CDR3 von BerH2"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGAA ATG CAT CAG ACC AGC ATG GGC ATC AAG ATG GAA TCA CAG ACT CTG	49
Met His Gln Thr Ser Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Leu	
-29 -25 -20 -15	
GTC TTC ATA TCC ATA CTG CTC TGG TTA TAT GGT GCT GAT GGG AAC ATT	97
Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile	
-10 -5 1	
GTA ATG ACC CAA TCT CCC AGA TCC ATG TCC ATG TCT GTA GGA GAG AGG	145
Val Met Thr Gln Ser Pro Arg Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg	
5 10 15	
GTC ACC TTG AGC TGC AAG GCC AGT GAG AAT GTG GAT ACT TAT GTA TCC	193
Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr Val Ser	
20 25 30	
TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATA TAC GGG	241
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly	
35 40 45 50	
GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA	289
Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly	
55 60 65	

-25-

TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC	337
Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp	
70 75 80	
CTT GCA GAT TAT CAC TGT GGA CAG AGT TAC AGA TAT CCT CCC ACG TTC	385
Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Arg Tyr Pro Pro Thr Phe	
85 90 95	
GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA	412
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 136 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met His Gln Thr Ser Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Leu Val	
-29 -25 -20 -15	
Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val	
-10 -5 1	
Met Thr Gln Ser Pro Arg Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val	
5 10 15	
Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr Val Ser Trp	
20 25 30 35	
Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala	
40 45 50	
Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser	
55 60 65	
Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu	
70 75 80	
Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Arg Tyr Pro Pro Thr Phe Gly	
85 90 95	
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

-26-

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 777 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 1..6
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Restriktionsschnittstelle
SallI, synthetisch"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 7..10

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 11..85
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon1

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
- (B) LAGE: 86..374

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 375..707
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= Exon2

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
- (B) LAGE: 708..777
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= J2-Intron

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: join(11..85, 375..707)
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Prim.prod. d. var.
Region d. leichten kappa-Kette v. BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 674..>777
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /function= "J2-Minigen"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
- (B) LAGE: join(11..85, 375..386)

-27-

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 387..>707
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region der leichten kappa-Kette von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 456..488
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR1 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 534..554
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR2 von BerH2"

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (B) LAGE: 651..677
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Variable Region CDR3 von BerH2"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GTCGACGGAA ATG CAT CAG ACC AGC ATG GGC ATC AAG ATG GAA TCA CAG	49
Met His Gln Thr Ser Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln	
-29 -25 -20	
ACT CTG GTC TTC ATA TCC ATA CTG CTC TGG TTA TAT GGTAACAT	95
Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr	
-15 -10 -5	
TTAAAGTAC TATAATATCT TAAATAATT AATTTGTAGA GAAATAGCTA TTTCCTATAG	155
GATGCCAATA GCATGCAGAC AATGCAATTA GAAAAGTTAT TTAAATCT AAAATCTTGC	215
TGGCATATCG ATGGTGACTG CGTTTGAGG CTGATTTTGG GATGGATCCC CCCCCAAAA	275
AAAGAAAAGA AAAGTTATTT TAGATTCCAA CGATTATGTA ATGAAGTCTT TTGTGTGTGT	335
GTGTGTGTAT ATATATATAT ACTCATTGTT CTGATTTC GGT GCT GAT GGG AAC	389
Gly Ala Asp Gly Asn	
-4 1	
ATT GTA ATG ACC CAA TCT CCC AGA TCC ATG TCC ATG TCT GTA GGA GAG	437
Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Arg Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu	
5 10 15	
AGG GTC ACC TTG AGC TGC AAG GCC AGT GAG AAT GTG GAT ACT TAT GTA	485
Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Thr Tyr Val	
20 25 30	

-28-

TCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATA TAC	533
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
35 40 45	
GGG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC GAT CGC TTC ACA GGC AGT	581
Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser	
50 55 60 65	
GGA TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA	629
Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu	
70 75 80	
GAC CTT GCA GAT TAT CAC TGT GGA CAG AGT TAC AGA TAT CCT CCC ACG	677
Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Arg Tyr Pro Pro Thr	
85 90 95	
TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGTAAGTAGT CTTCTCAATT	727
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	
TTGTTCACTA AGTCTAACCT TGTTAAGTGC GGCCGCACTA GTGATATCCC	777

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Institute of Pathology
UK Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin
medac
Fehlandtstr. 3
20354 Hamburg

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: CH-BerH2	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2224
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung <input type="checkbox"/> () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1995-08-08 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>U. Weiler</i></p> <p>Datum: 1995-08-18</p>


¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

HAUPTSTADT VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANLAGEUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Institute of Pathology
UK Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin
medac
Fehlandtstr. 3
20354 Hamburg

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Institute of Pathology UK Benjamin Franklin Anschrift: Hindenburgdamm 30 12200 Berlin medac Fehlandtstr. 3 20354 Hamburg	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2224 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1995-08-08
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1995-08-08 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1995-08-18

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

Patentansprüche

1. Rekombinante DNA-Moleküle, welche für variable Immunglobulinketten oder Fragmente derselben kodieren, die Spezifität für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 aufweisen, wobei die rekombinanten DNA-Moleküle Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen.
2. Rekombinante DNA-Moleküle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie jeweils einen oder mehrere der hypervariablen Bereiche der in den SEQ ID NOS: 1 oder 3 bzw. in den SEQ ID NOS: 4 oder 6 angegebenen Sequenzen oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen.
3. Rekombinante DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ miteinander verknüpft sind.
4. Rekombinante DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzen gemäß einer oder mehrerer der SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sind, die für konstante Teile eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls kodieren.
5. Rekombinante DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die in den SEQ ID NOS: 1, 3, 4 und/oder 6 angegebenen Sequenzen oder deren Fragmente oder syngene oder allelische Varianten derselben operativ mit DNA-Sequenzen verknüpft sind, die für toxische Proteine oder Enzyme kodieren.

-32-

6. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er ein oder mehrere der rekombinanten DNA-Moleküle nach den Ansprüchen 1 bis 5, operativ verknüpft mit Expressionskontroll-Sequenzen, enthält.
7. Expressionsvektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß er für die Expression in einer Prokaryonten-Wirtszelle geeignet ist.
8. Expressionsvektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß er für die Expression in einer Eukaryonten-Wirtszelle geeignet ist.
9. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einem der Vektoren nach den Ansprüchen 6 bis 8 transformiert ist.
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Prokaryonten-Zelle ist.
11. Wirtszelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Eukaryonten-Zelle ist.
12. Wirtszelle nach Anspruch 11 mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC2224.
13. Verfahren zur Herstellung von Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30, dadurch gekennzeichnet, daß man eine der Wirtszellen nach den Ansprüchen 9 bis 12 in einem geeigneten Nährmedium kultiviert, anschließend die Zellen von dem Medium abtrennt und die Liganden als Expressionsprodukte aus dem Medium oder aus dem Cytoplasma der Wirtszellen isoliert.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die Liganden anschließend reinigt und mit üblichen Hilfs-

und Trägerstoffen zu pharmazeutischen oder diagnostischen Präparaten formuliert.

15. Rekombinante Liganden für das menschliche Zellmembran-Antigen CD30, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens die in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben umfassen.
16. Rekombinante Liganden nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie jeweils einen oder mehrere der hypervariablen CDR-Bereiche der in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebenen Aminosäuresequenzen oder syngene oder allelische Varianten derselben umfassen.
17. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebene Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben untereinander verknüpft sind.
18. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß in den SEQ ID NOS: 2 und/oder 5 angegebene Aminosäuresequenzen oder Fragmente oder allelische Varianten derselben mit konstanten Teilen eines humanen oder tierischen Immunglobulinmoleküls verknüpft sind.
19. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie peptidisch oder über Linker-Moleküle mit toxischen Proteinen oder mit Enzymen bzw. Proenzymen verknüpft sind.
20. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Toxinen in Form von Ribosomen-inaktivierenden Proteinen verknüpft sind.

-34-

21. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Enzymen aus der Gruppe der Phosphodiesterasen verknüpft sind.
22. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie direkt oder über Linker-Moleküle kovalent oder konjugiert mit radioaktiven Isotopen verknüpft sind.
23. Rekombinante Liganden nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die radioaktiven Isotope aus der Gruppe bestehend aus Indium, Jod, Yttrium, Technetium, Rhenium, Kupfer und Lutetium ausgewählt sind.
24. Rekombinante Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie direkt oder über Linker-Moleküle kovalent oder konjugiert mit photoaktivierbaren Verbindungen verknüpft sind.
25. Diagnostische oder pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere der Liganden nach den Ansprüchen 15 bis 24 allein oder in Kombination mit üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln enthalten.
26. Diagnostische oder pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen oder mehrere Liganden herstellt nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 13 oder 14 allein oder in Kombination mit üblichen Trägerstoffen und Verdünnungsmitteln enthalten.
27. Verwendung der Präparate nach den Ansprüchen 25 oder 26 zur Diagnostik und/oder Behandlung von Krebsformen, bei denen das menschliche Zellmembran-Antigen CD30 gebildet wird.
28. Verwendung der Präparate nach Anspruch 27 zur Diagnose und/oder Behandlung der Hodgkinschen Erkrankung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/04765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K16/46 C07K16/28 C07K16/30 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 91 07437 A (D.L. PARKER) 30 May 1991 see the whole document, in particular page 12, line 31 - page 13, line 10 ---	1 15,19-24
Y	NATURE, vol. 342, no. 6245, 2 November 1989, LONDON GB, pages 99-100, XP000069444 J.D. RODWELL : "ENGINEERING MONOCLONAL ANTIBODIES" see the whole document ---	1
A	EP 0 256 654 A (CENTOCOR INC) 24 February 1988 see the whole document ---	1-4, 6-11, 13-19, 25-28
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 February 1997

Date of mailing of the international search report

28.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.

PCT/EP 96/04765

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 04189 A (MEDAC GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE SPEZIALPRÄPARATE) 3 March 1994 cited in the application see the whole document ---	1,15, 22-28
A	DE 42 05 938 A (MEDAC GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE SPEZIALPRÄPARATE) 2 September 1993 see the whole document ---	1,15,19, 20,25,27
A	WO 91 09966 A (ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION) 11 July 1991 see the whole document ---	1-28
A	WO 89 09622 A (PROTEIN DESIGN LABS INC) 19 October 1989 see the whole document ---	1,2,6,9, 15,16
A	BIOTECHNIQUES, vol. 7, no. 4, 1 January 1989, NATICK US, pages 360-366, XP000350904 Y. L. CHIANG ET AL.: "DIRECT CDNA CLONING OF THE REARRANGED IMMUNOGLOBULIN VARIABLE REGION" see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/04765

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9107437	30-05-91	AU-A- 6909191	13-06-91
EP-A-0256654	24-02-88	AT-T- 143052	15-10-96
		DE-D- 3751908	24-10-96
		DE-T- 3751908	06-02-97
		JP-A- 63112995	18-05-88
WO-A-9404189	03-03-94	AU-A- 4953693	15-03-94
DE-A-4205938	02-09-93	NONE	
WO-A-9109966	11-07-91	AT-T- 129017	15-10-95
		AT-T- 124459	15-07-95
		AU-B- 664801	30-11-95
		AU-A- 6461294	22-12-94
		AU-B- 646009	03-02-94
		AU-A- 6974091	24-07-91
		AU-B- 649645	02-06-94
		AU-A- 7033091	24-07-91
		AU-B- 631481	26-11-92
		AU-A- 7048691	24-07-91
		BG-B- 60462	28-04-95
		CA-A- 2037607	07-09-92
		CA-A- 2046904	22-06-91
		CA-A- 2050479	22-06-91
		DE-D- 69020544	03-08-95
		DE-T- 69020544	18-01-96
		DE-D- 69022982	16-11-95
		DE-T- 69022982	28-03-96
		EP-A- 0460167	11-12-91
		EP-A- 0460171	11-12-91
		EP-A- 0460178	11-12-91
		EP-A- 0620276	19-10-94
		EP-A- 0626390	30-11-94
		ES-T- 2079638	16-01-96
		ES-T- 2074701	16-09-95
		WO-A- 9109967	11-07-91
		WO-A- 9109968	11-07-91
		GB-A,B 2246781	12-02-92
		GB-A,B 2246570	05-02-92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/04765

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9109966		GB-A,B 2268744	19-01-94
		GB-A,B 2268745	19-01-94
		JP-T- 4505398	24-09-92
		JP-T- 4506458	12-11-92
		JP-T- 5500312	28-01-93

WO-A-8909622	19-10-89	AU-B- 631545	03-12-92
		AU-A- 3544589	03-11-89
		EP-A- 0362371	11-04-90
		JP-T- 2503867	15-11-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inn. : nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04765

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K16/46 C07K16/28 C07K16/30 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y A	WO 91 07437 A (D.L. PARKER) 30.Mai 1991 siehe das ganze Document, insbesondere Seite 12, Zeile 31 - Seite 13, Zeile 10 ---	1 15,19-24
Y	NATURE, Bd. 342, Nr. 6245, 2.November 1989, LONDON GB, Seiten 99-100, XP000069444 J.D. RODWELL : "ENGINEERING MONOCLONAL ANTIBODIES" siehe das ganze Dokument ---	1
A	EP 0 256 654 A (CENTOCOR INC) 24.Februar 1988 siehe das ganze Dokument ---	1-4, 6-11, 13-19, 25-28
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12.Februar 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28.02.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

De Kok, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04765

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 04189 A (MEDAC GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE SPEZIALPRÄPARATE) 3.März 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,15, 22-28
A	DE 42 05 938 A (MEDAC GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE SPEZIALPRÄPARATE) 2.September 1993 siehe das ganze Dokument ---	1,15,19, 20,25,27
A	WO 91 09966 A (ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION) 11.Juli 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-28
A	WO 89 09622 A (PROTEIN DESIGN LABS INC) 19.Oktober 1989 siehe das ganze Dokument ---	1,2,6,9, 15,16
A	BIOTECHNIQUES, Bd. 7, Nr. 4, 1.Januar 1989, NATICK US, Seiten 360-366, XP000350904 Y. L. CHIANG ET AL.: "DIRECT CDNA CLONING OF THE REARRANGED IMMUNOGLOBULIN VARIABLE REGION" siehe das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04765

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9107437	30-05-91	AU-A- 6909191	13-06-91
EP-A-0256654	24-02-88	AT-T- 143052	15-10-96
		DE-D- 3751908	24-10-96
		DE-T- 3751908	06-02-97
		JP-A- 63112995	18-05-88
WO-A-9404189	03-03-94	AU-A- 4953693	15-03-94
DE-A-4205938	02-09-93	KEINE	
WO-A-9109966	11-07-91	AT-T- 129017	15-10-95
		AT-T- 124459	15-07-95
		AU-B- 664801	30-11-95
		AU-A- 6461294	22-12-94
		AU-B- 646009	03-02-94
		AU-A- 6974091	24-07-91
		AU-B- 649645	02-06-94
		AU-A- 7033091	24-07-91
		AU-B- 631481	26-11-92
		AU-A- 7048691	24-07-91
		BG-B- 60462	28-04-95
		CA-A- 2037607	07-09-92
		CA-A- 2046904	22-06-91
		CA-A- 2050479	22-06-91
		DE-D- 69020544	03-08-95
		DE-T- 69020544	18-01-96
		DE-D- 69022982	16-11-95
		DE-T- 69022982	28-03-96
		EP-A- 0460167	11-12-91
		EP-A- 0460171	11-12-91
		EP-A- 0460178	11-12-91
		EP-A- 0620276	19-10-94
		EP-A- 0626390	30-11-94
		ES-T- 2079638	16-01-96
		ES-T- 2074701	16-09-95
		WO-A- 9109967	11-07-91
		WO-A- 9109968	11-07-91
		GB-A, B 2246781	12-02-92
		GB-A, B 2246570	05-02-92

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04765

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9109966		GB-A, B 2268744	19-01-94
		GB-A, B 2268745	19-01-94
		JP-T- 4505398	24-09-92
		JP-T- 4506458	12-11-92
		JP-T- 5500312	28-01-93

WO-A-8909622	19-10-89	AU-B- 631545	03-12-92
		AU-A- 3544589	03-11-89
		EP-A- 0362371	11-04-90
		JP-T- 2503867	15-11-90
